



EESTI MAAÜLIKOOL

Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Karina Palmroos

**TUBAKA MOSAIKVIIRUSE ESINEMINE EESTIS
MÜÜDAVATES SIGARETTIDES**

**DETECTION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS IN CIGARETTES
PURCHASABLE IN ESTONIA**

Bakalaureusetöö

Aianduse õppekava

Juhendajad: Kadri Just, *PhD*

Professor Anders Kvarnheden, *PhD*

Tartu 2021

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51006		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Karina Palmroos		Õppekava: Aiandus	
Pealkiri: Tubaka mosaiikviiruse esinemine Eestis müüdavates sigarettides			
Lehekülgi: 51	Jooniseid: 12	Tabeleid: 4	Lisasid: 5
Osakond: Taimetervise Õppetool Uurimisvaldkond: Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused (B390) Juhendajad: Professor Anders Kvarnheden, <i>PhD</i> Kadri Just, <i>PhD</i> Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu, 2021			
<p>Tubaka mosaiikviirus (<i>Tobacco mosaic virus</i>, TMV) on mehhaaniliselt edasikanduv ja väga stabiilne viirus. TMV-l on üle 100 peremeestaime ning sigarettides võib see nakkusvõimelisena säilida aastakümneid. TMV on levinud kogu maailmas ja nakatab lisaks tubakale paljusid teisi taimi, enamasti maavitsaliste sugukonnast. TMV sümptomid on mosaiik, kloroos, lehtede keerdumine ja muu moondumine ning kasvupeetus.</p> <p>Viirusosake on pulgakujuline, sisaldab RNA genoomi ning kodeerib nelja geeni: liikumine, kattevalk ja kaks paljunemisega seotud valku. Lisaks sellele, et TMV on paljudel kultuuridel oluline patogeen, on see ajalooliselt olnud väga oluline viirus, mõistmaks geneetilise koodi (kuidas DNA-st või RNA-st saavad valgud) struktuuri ja funktsiooni erinevates organismides. Töö eesmärk oli selgitada, kas Eestis müüdavates sigarettides ja sigarillodes esineb tubaka mosaiikviirust ja selgitada viiruse geneetiline kuuluvus.</p> <p>Katseid alustati 2020 aasta juulis ja taimi nakatati mehaaniliselt, testides 15-st erinevast suitsupakist juhusliku valiku alusel 3 sigaretti. Seejärel testiti inokuleeritud taimi kiirtestiga. Positiivsetest proovidest analüüsiti TMV nakkust molekulaarsete meetoditega. TMV-le iseloomulikud sümptomid ilmnesid kümnel proovil, kiirtesti põhjal</p>			

esines TMV 15-st suitsumargist 14-l. Molekulaarse määramise tulemusel tuvastati viirus ühes sigaretiproovis ning see oli 95.68% identne TMV isolaadile Hiinast.

Märksõnad: TMV, mehhaaniline inokulatsioon, *Nicotiana benthamiana*

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51006		Abstract of Bachelor Thesis	
Author: Karina Palmroos		Specialty: Horticulture	
Title: detection of tobacco mosaic virus in cigarettes and purchasable in Estonia			
Pages: 51	Figures: 12	Tables: 4	Appendixes: 5
Department: Chair of Plant Health Field of research: Agricultural Research, B390 Supervisors: Professor Anders Kvarnheden, <i>PhD</i> ; Kadri Just, <i>PhD</i> Place and date: Tartu 2021			
<p>Tobacco mosaic virus (TMV) is a mechanically transmitted and very stable virus. TMV has more than 100 host plants and can remain infectious in cigarettes for decades. TMV is widespread throughout the world and infects many other plants in addition to tobacco, mostly from the family Solanaceae. Symptoms of TMV include mosaic, chlorosis, leaf twisting and other deformation, and growth retardation.</p> <p>The virus particle is rod-shaped, contains the RNA genome, and encodes four genes: movement, coat protein, and two replication proteins. In addition to being an important pathogen for many, TMV has historically been a very important virus in understanding the structure and function of the genetic code (how proteins become DNA or RNA) in various organisms. The aim of the study was to find out whether tobacco mosaic virus is present in cigarettes and cigarillos in Estonia and to find out the genetic affiliation of the virus.</p> <p>The experiments were started in July 2020 and the plants were mechanically infected by testing 3 cigarettes from 15 different smoke packs on a random basis. The inoculated plants were then tested by a rapid test (Agristrip, Bioreba). Positive samples were analyzed for TMV infection by molecular methods. Symptoms characteristic of TMV were seen on ten samples,</p>			

with 14 of the 15 cigarette brands showing TMV in a rapid test. Molecular detection revealed the virus in one sample of cigarettes and was 95.68% identical to the TMV isolate from China.

Keywords: TMV, mechanical inoculation, *Nicotiana benthamiana*.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	8
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1.Tubaka mosaiikviiruse peremeestaimed ja sümptomid	10
1.2.TMV leviku viisid ja liikumine nakatunud taimes	11
1.3 Tubaka mosaiikviiruse mõju inimesele	12
1.4. <i>Nicotiana benthamiana</i> ehk tubakataim	13
1.4.1. <i>N. benthamiana</i> kui mudelorganism	14
2. METOODIKA	16
2.1. TMV mehhaaniline inokulatsioon ehk nakatamine	16
2.2. TMV nakkuse määramine kiirtestiga.....	17
2.3. Nakkuse molekulaarne määramine	18
2.3.1. RNA eraldamine.....	18
2.3.2. RNA kontsentratsiooni määramine	20
2.3.3. RNA puhastamine DNA-st (DNase töötlus)	20
2.3.4. Pöördtranskriptsioon	21
2.3.5. PCR amplifikatsioon TMV molekulaarseks määramiseks.....	21
2.3.6 DNA visualiseerimine geelelektroforeesiga.....	22
2.3.7. PCR amplifikatsiooniproduktide puhastamine.....	22
2.3.8 DNA järjestuse määramine ehk sekveneerimine ja fülogeneetiline analüüs	23
3. TULEMUSED JA ARUTELU	24
3.1. Sümptomite ilmnemine mehhaanilise inokulatsiooni järel.....	24
3.2. TMV määramine kiirtestiga.....	27
3.3. TMV nakkuse molekulaarne määramine	27
3.3.1. RNA eraldamine ja kontsentratsioon	28
3.3.2. Pöördtranskriptsioon ehk cDNA süntees	29
3.3.3. TMV amplifikatsioon RT-PCR-ga.....	31
3.3.4. TMV sekveneerimine ja fülogeneetiline analüüs	33

KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	37
KASUTATUD KIRJANDUS.....	38
LISAD	43
Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	50
ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	50

SISSEJUHATUS

Tubaka mosaiikviirus (*Tobacco mosaic virus*, TMV, perekond *Tobamovirus*, sugukond *Virgaviridae*) on levinud kogu maailmas (Hema *et al.* 2019). TMV-l on üle 100 peremeestaime, lisaks tubakale nakatab see paljusid teisi taimi, enamasti maavitsaliste sugukonnast (Caciagli 2008). TMV on väga stabiilne, sigarettides võib see nakkusvõimelisena säilida aastaid (Scholthof 2000). Viirus levib mehhaaniliselt, kandudes edasi vigastuste ja taimedevahelise kontakti kaudu (Rifkind, Freeman 2005). TMV sümptomid on mosaiik, kloroos, lehtede keerumine ja moondumine ning kasvupeetus (Alishiri *et al.* 2013). Lisaks sellele, et TMV on paljudel kultuuridel oluline patogeen, on see ajalooliselt olnud väga oluline viirus, mõistmaks geneetilise koodi funktsiooni erinevates organismides (Gergerich, Dolja 2006).

Tubaka mosaiikviirus on esimene avastatud ja keemiliselt puhastatud viirus (Smith, Dombrovsky 2019). Selle tuvastas 1889. aastal Hollani mikrobioloog ja botaanik, üks viroloogia rajajaid Martinus Beijerinck. Martinus ütles viiruse kohta „tubaka mosaiigihäigus“, mille on põhjustatud patogeen, mis on võimeline taime peremeesrakkudes paljunema. Ta nimetas seda viiruseks (ladina k. mürk), et eristada seda haigusvormi bakterite põhjustatud haigusest (Kurd 2019). Beijerinck oli kasutanud kahte filtreerimistehnikat- Chamberlandi filtrit ja difusiooni läbi agari, et näidata, et TMV põhjustab tervete tubakalehtedele hõõrumisel nakkust. Tema uuringutes täheldati süsteemset infektsiooni kahe nädala jooksul. Ta tõestas ka seda, et bakterid ei olnud nakkuse põhjuseks (Kelman, Peterson 2002).

TMV RNA-d kasutati esimestes otsustavates katsetes, mis näitasid, et nukleiinhapped kannavad pärilikku ainet ning et ainult nukleiinhappest piisab viiruse nakkavuse tagamiseks (Smith, Dombrovsky 2019). TMV oli esimene viirus, mille puhul määrati kattevalgu aminohappeline järjestus. Molekulaarbioloogia arengu alguses kasutati TMV RNA-d laialdaselt mitokondriaalse RNA-na, mida oli lihtne puhastada ja see aitas palju kaasa valgusünteesi uurimisele (Kurd 2019).

Töö eesmärk oli selgitada, kas Eestis müüdavates sigarettides esineb TMV-d. Töö hüpoteesiks oli, et Eestis müüdavates sigarettides ja sigarillodes esineb tubaka mosaiikviirust. Kuna sigaretis on TMV kiirtestiga määramiseks tõenäoliselt liiga madalas kontsentratsioonis, viidi läbi inokulatsioon, nakatades tubakataimi sigaretist pärit lahusega. Nii paljuneb positiivse proovi TMV inokuleeritud taimes, kus viiruse kontsentratsioon saavutab piisava taseme, analüüsimeks proovi kiirtestiga. Kiirtestiga positiivseks ostunud proovidest viidi läbi viiruse molekulaarne määramine. Kiirtest on väga hea moodus nakatunud taimede kiireks selekteerimiseks. Nii saab kiiresti identifitseerida taimed, mida molekulaarselt täpsemalt uurida.

Ma soovin tänada oma bakalaureuse töö juhendajaid, Kadri Justi ja Professor Anders Kvarnhedeni abi ja juhendamise eest lõputöö koostamisel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Tubaka mosaiikviiruse peremeestained ja sümptomid

Tubaka mosaiikviirusel on vardakujulised viirusosakesed ehk virionid, mis on umbes 300 nm x 15 nm suurusel. Üks viiruse osake koosneb 2130 kattevalgu (CP) kapsomeerist, mis moodustab virioni kapsiidi. See ümbritseb umbes 6400 nukleotiidi pikkust RNA molekuli (Scholthof 2000). TMV virioni ümbritseb umbes 130 kapsomeeride pööret, iga kolme spiraali pöörde kohta on 49 kapsomeeri. Varda keskne südamik on umbes 40 Å (ongström, 1 Å=0,1 nanomeetrit) läbimõõduga. Iga kapsomeer on viinamarjasarnane struktuur, mis sisaldab umbes 158 aminohapet ja mille molekulmass on 17 000 daltonit. Tsentraalselt paiknev üheaahelalisest RNA moodustab virionist 5,6% ning seda ümbritsev valgukate hõlmab ülejäänud 94,4%. TMV üheaahelaline RNA kodeerib nelja geeni: kahte replikaasiga seotud valku, mis tõlgitakse otse TMV RNA-st, ning liikumisvalku ja kattevalku, mis on tõlgitud subgenoomsetest RNA-dest (Garg 2021).

Lisaks tubakale nakatab TMV tomatit, paprikat ja teisi maavitsaliste sugukonda kuuluvaid taimi (Scholthof 2000, Hu *et al.* 2011), kurgitaimi, ilu- ja ravimtaimi ning erinevaid umbrohtusid (Webster *et al.* 2014, Ambros *et al.* 2016). TMV põhjustatud sümptomiteks on mosaiik, laigulisus, nekroos, lehtede kõverdumine, taimekudede kolletumine ning kasvupeetus. Esmakordselt ilmnevad sümptomid umbes 10 päeva pärast nakatumist (Kurd 2019). Taimed tavaliselt ei hukku, kuid kasvu võib tõsiselt pidurdada. Spetsiifilised sümptomid sõltuvad peremeestaimest, nakatunud taime vanusest, keskkonnatingimustest, viirusetüvest ja peremeestaime geneetilisest taustast. Praegu hinnatakse TMV-st tingitud tubaka saagikadu ainult 1% -ni, kuna tavapäraselt kasvatatakse resistentseid sorte (Scholthof 2000). Seevastu tomati puhul on teatatud kuni 20% -listest kadudest. Lisaks võib viljade halb kvaliteet vähendada saagi kaubanduslikku väärtust (Scholthof 2000).

1.2. TMV leviku viisid ja liikumine nakatunud taimes

TMV on mehhaanilisel teel kergelt leviv viirus. Peamiselt nakatuvad taimed agrotehniliste võtete rakendamisel tekkinud vigastuste ja TMV-ga kokkupuutunud tööriistade kaudu (Smith, Dombrovsky 2019; Kurd 2019). Erinevalt enamikust teistest viirustest ei hävi TMV peremeestaime hukkudes ja talub kõrgeid temperatuure. Seega võib viirus ellu jääda tööriistadel, võreidel, juhtmetel, vaiadel, kasvuhoonepinkidel, konteineritel ja saastunud riidel mitmeid kuid. Samuti võib see ellu jääda mullapinnal olevates põllukultuuride jääkides ja nakatada sealt uue saagi. Ka tubakatooted võivad sisaldada TMV-d (Kurd 2019).

Olulisel määral levib TMV suitsetavate töötajate kaudu, kui nende käed puutuvad kokku TMV-ga nakatunud sigarettidega (Scholthof, 2000). Nii võib viirus taimelt taimele levida töötajate kätelt, rõivastelt või tööriistadelt nagu oksakäärid. Taimede käsitsemisel kahjustuvad väikesed lehekarvad ja mõned välimised rakud paratamatult ning lekivad mahla kätele, tööriistadele ja riidele (Kurd 2019). TMV on väga stabiilne ja nakkusohtlik ka pinnases, mis sisaldab viirusega nakatunud taimi ja taimeosi (Latern *et al.* 1982).

Lisaks võib TMV levida ka seemnete (Jimenez-Lopez 2017) ja tolmeldajate abil (Darzi *et al.* 2018, Levitzky *et al.* 2019). TMV levik seemnete kaudu on üldiselt suhteliselt madal (Jimenez-Lopez 2017), mis tuleneb sellest, et enamasti ei nakatu seemnes viirusega embrüo. Seemnekatte saastumine võib ilmnedda seemnete ja viljaliha vahelise füüsilise kinnitumise tõttu (Smith, Dombrovsky 2019). Nakatunud taimede seemned võivad viirust kanda ka nende seemnekestal. Mida varasem on emataime nakatumise vanus, seda tõenäolisem on seemne koristamisel seemnekesta saastumine viirusega (Kurd 2019).

TMV osakesed on võimelised säilima aastakümned ja suudavad üle elada 90 °C kuumutamise (Smith, Dombrovsky 2019; Soloyev, Makarov 2016). Viiruse edasikandumise jaoks on vajalik kattevalk (Smith, Dombrovsky 2019, Hipper *et al.* 2013). See on vajalik viiruse liikumiseks üle

vaskulaarse parenhüümi ja kaasrakkude vahelise piiri (Ding *et al.* 1996). Floemis viiruseosakesed järgivad fotoassimileeritud transporti (Smith, Dombrovsky 2019).

TMV kasutab oma liikumisvalku rakust rakku levimiseks plasmodesmata kaudu, mis ühendavad taimerakke (Itaya *et al.* 1998). Liikumisvalk suurendab plasmodesmaalseid avausi, nii et TMV RNA saab liikuda külgnevatesse rakkudesse. Kui viirus liigub rakust rakku, jõuab see lõpuks taime vaskulaarsüsteemi, et see saaks kiiresti ja süsteemselt levida floemi kaudu kasvava taime juurtesse ja tippudesse (Dombrovsky, Smith, 2019).

Kui TMV on nt. läbi mehhaanilise vigastuse taime sisenenud, siis peremeesraku sees dissotsieerub valgukiht ja viiruse nukleiinhape vabaneb raku tsütoplasmas. Viiruse RNA kutsub kõigepealt esile spetsiifiliste ensüümide aktiivsuse, mida nimetatakse RNA polümeraasideks. Üheaheelaline viiruse RNA sünteesib täiendava RNA-ahela, mida nimetatakse replikatiivseks RNA-ks. Uued viiruse-RNA-d vabastatakse tuumast tsütoplasmasse ja toimivad messenger-RNA-dena (mRNA-d). Iga mRNA juhib koostöös peremeesraku ribosoomide ja t-RNA-ga valgu subühikute sünteesi. Pärast soovitud valgu alaühikute (kapsomeeride) tootmist moodustub täielik viirusosake, virion. Peremeesorganid jäävad enamasti ellu ja viirusosakesed liiguvad rakkudevaheliselt, põhjustades süsteemse infektsiooni (Garg 2021).

1.3 Tubaka mosaiikviiruse mõju inimesele

Tänu oma stabiilsusele kõrgel temperatuuril on TMV tubaka tootmisprotsessidele vastupidav ja võib aastaid säilida sigarettides, närimistubakas ja sigarites. Erinevalt loomaviirustest ei saa taimeviirused paljuneda inimestel ega loomadel, peamiselt seetõttu, et peremeesrakkudesse äratundmiseks ja sisestamiseks pole spetsiifilisi retseptoreid. Siiski on tõestatud, et lillkapsa mosaiikviirus siseneb hiirtel soolestiku kaudu vereringesse ja lokaliseerub kesknärvisüsteemis (Shriver *et al.* 2009; Olszewska 2003). Uuringud on näidanud ka inimese väljaheites pipra laigulisuse viiruse olemasolu (Colson *et al.* 2010). See viitab, et taimeviirustel võib olla teatud mõju ka inimestele ja loomadele.

Viirust ei saa põleva tubaka suitsus levida, kuid suitsetajad, eriti need, kes ise sigarette keerutavad, võivad seda viirust oma kätel kanda ja tervetele taimedele edasi viia (Liu *et al.* 2013). Mahlast toituvad putukad, näiteks lehetäid, ei saa TMV-d edasi kanda. Kuid närivate suistega putukad nagu rohutirtsud ja röövikud, edastavad viirust aeg-ajalt. Neid ei peeta siiski olulisteks vektoriteks (Kurd 2019).

Suitsetajatel oli seerumi antikehareaktsioon TMV suhtes kõrgem kui tubakat mitesuitsetajatel, kuigi ka mittekasutajad olid seroposiitvused. Lisaks on avastatud, et TMV vastased antikehad ristreageerivad inimvalguga TOMM40L- mitokondriaalse välismembraani alaühikuga, mis sisaldas tugevat aminohapete homoloogiat TMV kattevalguga (Liu *et al.* 2013). TMV-d kasutatakse laialdaselt taimse viiruse ekspresseerimisvektoritena vaktsiini antigeenide ja biofarmatseutiliste valkude tootmiseks, kuid inimeste kohta on piiratud andmeid TMV virioonide esilekutsutud immuunvastuste kohta (Holzem *et al.* 2001). TMV uuringud 20. sajandi esimestel kümnenditel põhjustasid paradigma muutusi, luues põhialused viiruse olemuse uurimiseks ja määratlemiseks. Viimase sajandi jooksul on TMV olnud erakordne tööriist uurimistööde jaoks alates struktuuriabioloogiast kuni peremeestaimede resistentsuseni. TMV muutus salapärasest haigusetekiitajast mudelorganismiks, mida kasutatakse taime ja patogeeni vastastikmõjude molekulaarsete seadyspörasuste uurimiseks (Scholtz 2008).

1.4. *Nicotiana benthamiana* ehk tubakataim

Nicotiana benthamiana kuulub maavitsaliste (*Solanacea*) sugukonda, kuhu kuuluvad ka nt. pipar, tomat, kartul ja petuunia. Tubaka looduslik levik piirdub peamiselt Ameerika ja Austraaliaga. Liigid, mida on kasvatatud ja kasutatud kaubanduslikuks tubakatootmiseks, pärinevad Lõuna-Ameerikast, eriti Andide mägismaalt (Scholthof 2008). Perekonda *Nicotiana* kuulub peamiselt 76 troopilise ja subtroopilise levikuga liiki neljal mandril, enamus neist levivad Lõuna-Ameerikas ja Austraalias (Knapp *et al.* 2004).

Koloniaal-Ameerikas oli tubakas edukas sularahakultuur ja seda kasutati seadusliku maksevahendina (Scholthof 2008). Tubakat, nagu teisigi põllukultuure, kasvatatakse sageli monokultuuridena- ühe kultuuri kasvatamine suurtel põldudel, sageli samal maatükil aasta-

aastalt. Intensiivse kasvatamise tulemusena kurnab tubakas oluliste toitainete sisaldust mullas ja taimed muutuvad haigustele vastuvõtlikumaks. Tänapäeval kasvatatakse *Nicotiana* taimi Hiinas, Brasiilias, Indias, Ameerika ühendriigikides, Indoneesias, Pakistanis, Argentiinas, Tanzaanias, Zimbabwes ja Zambias (FAO 2017).

Nicotiana haploidsete kromosoomide arv võib olenevalt liigist olla 16 (32), 18, 19, 20, 21, 22, 23 ja 24. *N. benthamiana* on üks kahest liigist, millel on 19 kromosoomipaari, teine on *N. excelsior* Kesk-Austraaliast Goodin, 2008), millega on *benthamiana* tihedalt seotud (Chase *et al.* 2003). *N. benthamiana* haploidse genoomi suurus on hinnanguliselt 3,2 pg (= 3136 Mbp) (Bennett, Leitch 1995; Goodin, 2008).

1.4.1. *N. benthamiana* kui mudelorganism

N. benthamiana on taimeviroloogia katsetöös kõige laialdasemalt kasutatav taim (Goodin *et al.* 2007). Seda peamiselt tänu asjaolule, et taim on viirustele küllaltki vastuvõtlik ja seda on lihtne nakatada. Lisaks on maavitsaliste sugukonda kuuluv *N. benthamiana* vastuvõtlik paljudele teistele taimepatogeenidele nagu bakterid, munasseened ja seened. Seetõttu on tubakas patogeenide uurimisel nurgakiviks. Veelgi enam, *N. benthamiana*-t saab geneetiliselt muundada ning hõlpsasti kasutada viiruse geenide vaigistamiseks või ajutiselt valgu ekspressiooni hõlbustamiseks. Lisaks on see taim oluline valgu lokaliseerimist vajavates uuringutes ning interaktsiooni või taimepõhiste valkude ekspresseerimiseks ja puhastamiseks (Knapp *et al.* 2004).

Taimsete viiruspõhiste vektorite väljatöötamine viis tehnoloogiani, mida nimetatakse viiruse poolt indutseeritud geeni vaigistamiseks (VIGS) (Kumagai *et al.* 1995; Thomas *et al.* 2001). VIGS võimaldab praktiliselt kõigi taimede jaoks huvipakkuvate geenide suunatud süsteemse vähendamise, muutes *N. benthamiana* võimsaks pöördgeneetiliseks süsteemiks (Dong *et al.* 2007; Fu *et al.* 2005; Liu *et al.* 2002; Ratcliff *et al.* 2001). *N. benthamiana* on väga populaarne uurimismudel ka seetõttu, et agroinfiltratsiooni teel saab huvipakkuvaid valke, mida sageli väljendatakse autofluorestseeruvate valkude liitumisena, tubaka rakkudes ajutiselt toota (Goodin *et al.* 2002; Schob *et al.* 1997; Voinnet *et al.* 2003).

Asjaolu, miks *N. Benthamiana* kergesti nakatub, on seotud universaalne viirusetundlikkusega ning on vähemalt osaliselt seotud *N. benthamiana* genoomis esineva RNA-sõltuva RNA polümeraasi geeni (NbRdRP1m) looduslikult esineva mutatsiooniga. Tõhustatud viirusresistentsus omistatakse taimedele, mis ekspresseerivad vastavat *Medicago truncatula* geeni (Goodin 2008).

2. METOODIKA

2.1. TMV mehhaaniline inokulatsioon ehk nakatamine

Katses uuriti 15 erinevat sigareti- ja sigarillo marki, mis ostetud Tartust 2020. aasta jooksul (Tabel 1). Iga proovi jaoks nakatatati kolm *Nicotiana benthamiana* taime, st. kolm tehnilist kordust. Taimed olid nakatamise ajal 3-4 pärislehe staadiumis. Töö ajal kanti kindaid ning vahetatati neid pärast iga erineva sigaretimargiga töötamist. Esmalt nakatatati kolm negatiivset kontrolltaime ainult vee ja ränikarbiid pulbriga. Ränipulbrit raputati kahele ülemisele lehele, kinnastega pandi lehtedele veidi vett ja hõõruti sõrmega õrnalt üle lehtede. Sigaretiprooviga nakatamiseks lisati umbes 6 ml vett kilekotti. Kolmest sigaretist raputati väike osa kilekotti, kus oli juba vesi sees.

Plastiktuubiga purustati sigarettide ja vee segu kilekoti pinnalt, kuni lahus muutus ühtlaseks ja värvus pruunikaks. Ränikarbiid pulber raputati kahele ülemisele lehele, pipeteeriti 250 µl sigaretivedelikku ühele lehele (taime kohta kokku 500 µl) ja hõõruti sõrmega õrnalt üle lehe. Ühe sigaretiprooviga nakatati kolm taime. Uue sigaretiprooviga töötamiseks vahetatati kindaid ja võeti uued töövahendid. Nakatatud taimi kasteti kuni kaks korda nädalas, sh. üks kord nädalas väetati neid Baltic Agro lillede, marjade ja köögiviljade vedelväetisega.

Tabel 1. Uuritavad sigareti- ja sigarimargid

Proovi nr.	Sigareti mark
1	Mark, Original Green
2	Camel, Blue
3	West, Original
4	Rothmans, Kingsize Silver
5	LD, Green
6	Chesterfield, Compact Blue
7	Chesterfield, Green
8	Marlboro, Red
9	L&M, Blue
10	Winston, XStyle Silver
11	Kent, Core
12	Marlboro Gold
13	Winston Cigarillos Option Blue
14	Winston Cigarillos Purple Green
	LD Cigarillos (Green) Liggett
15	Ducat

2.2. TMV nakkuse määramine kiirtestiga

Kiiresti kasutati nakatunud taimede skriinimiseks. Kõigi proovide iga kordus testiti TMV-ga nakkuse kindlakstegemiseks kiirtestiga Agristrip (Bioreba) (Joonis 1.A). Tubakataimelt võeti kuu aega pärast nakatamist ülemiselt noorelt lehelt ~ 0.1 g kaaluv tükk (ühe-eurose mündi suurune lehetükk) ja asetati see ekstraktsioonikotti, kuhu lisati juurde 3 ml lahust „A“ (Joonis 1.B). Proovi homogeniseeriti, kuni leht oli lahustunud ja lahus rohelineks värvunud (Joonis 1.C). Ekstraktsioonikotist pipeteeriti 37,5 µl homogeniseeritud lehe lahust ja asetati see testtubli, kuhu lisati 112,5 µl ekstraktsioonilahust „A“ (kokku 150 µl) (Joonis 1.D). Seejärel asetati testriba noolte ja „Sample“ otsaga lahusesse ja oodati triipude teket (ootaeg ~2- 15 min) (Joonis 1.E). Kahe triibu ilmumine tähendab, et proov on TMV-ga nakatunud ja üks triip näitab, et proovis viirust ei ole (Joonis 1.F).



A. TMV kiirtest



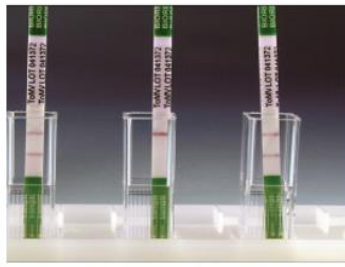
B. Proov ekstraksioonikotis



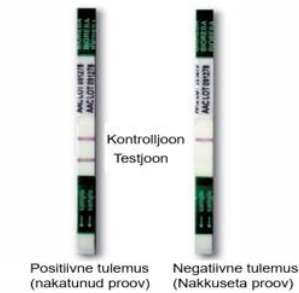
C. Proovi homogeniseerimine



D. Homogeniseeritud proovi asetamine testtubis



E. Testribad proovi tuubides



F. Tulemuste võrdlus

Joonis 1. TMV nakkuse määramine kiirtestiga. Fotod: Bioreba.

2.3. Nakkuse molekulaarne määramine

2.3.1. RNA eraldamine

RNA eraldati kuu aega pärast inokulatsiooni, kasutades RNeasy Plant Mini Kit-i (Qiagen) vastavalt tootja juhendile:

- 1) Lehe tükid (~0.3g) asetati uhmrisse, millesse oli eelnevalt valatud veeldatud lämmastik (vN). Proov purustati nuiaga. Protseduur viidi läbi kiiresti, laskmata proovil ülesse sulada. Vajadusel lisati vN-i juurde. Veeldatud lämmastiku asetati külmutamiseks 2 ml tuub ning sellesse kaaluti 0.1 g (100 mg) purustatud proovi pulbrit;
- 2) tuubi lisati 450 µl RLT puhvrit. Proovi segati Vortex masinal mõned hetked. Vajadusel (kui proovi lahuses olid sees suuremad tükid) inkubeeri proovi 1-3 min 56 °C;

- 3) lahus pipeteeriti lillasse 2 ml kollektsoontuubi ning tsentrifuugiti 2 min täiskiirusel. Kollektsoontuubi põhjas olev lahus pipeteeri ettevaatlikult uude 1.5 -2 ml tuubi nii, et ei puudutaks pipeti otsaga tuubi põhja kogunenud taime rakkude kogumit (enamik jäi kollektsoontuubi kinni, kuid osa läks ikkagi sellest läbi tuubi põhja). Tööd jätkati kollektsoontuubist läbi tulnud proovi lahusega;
- 4) proovile lisati 0.5-kordne kogus 96-100% etanooli (400 µl proovile lisati 200 µl etanooli) ning segati seda koheselt pipeteerides üles-alla 2-3 korda;
- 5) proov pipeteeriti roosasse 2 ml kollektsoontuubi. Tuubi kaas suleti õrnalt ja tsentrifuugiti 15 s kiirusel 10 000 rpm. Tuubi põhja kogunenud vedelik visati ära. Tööd jätkati sama kollektsoontuubiga;
- 6) roosasse kollektsoontuubi lisati 700 µl RW1 puhvrit. Tuubi kaas suleti õrnalt (et vedelik ei pritsiks välja) ja tsentrifuugiti 15 s kiirusel 10 000 rpm. Tuubi põhja kogunenud vedelik visati ära, veendudes, et kogu vedelik oleks eemaldatud. Tööd jätkati sama roosa tuubiga;
- 7) proovile lisati 500 µl RPE puhvrit. Tuub suleti ettevaatlikult ja tsentrifuugiti 15 s kiirusel 10 000 rpm. Tuubi põhja kogunenud vedelik visati ära ja jätkka tööd sama roosa tuubiga;
- 8) proovile lisati 500 µl RPE puhvrit. Tuub suleti ettevaatlikult ja tsentrifuugi 2 min kiirusel 10 000 rpm. Pärast tsentrifuugi eemaldati sisemine tuub ettevaatlikult, nii et see ei läheks kontakti välimises tuubis oleva lahusega;
- 9) sisemine kollektsoontuub asetati uude 2 ml tuubi (ilma kaaneta) ning visati ära eelmisest sammust pärit väline kollektsoontuub koos lahusega. Tuub suleti ettevaatlikult ja tsentrifuugi täiskiirusel (13 000 -14 000 rpm) üks min;
- 10) sisemine kollektsoontuub asetati uude 1.5 ml tuubi, millele lisati 30-50 µl RNase-vaba vett. Tuub suleti ettevaatlikult ja tsentrifuugi üks minut kiirusel 10 000 rpm. Sellega oligi taime RNA koos viiruse RNA-ga eraldatud.

2.3.2. RNA kontsentratsiooni määramine

RNA kontsentratsioon määratati NanoDrop 1000 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific, Joonis 2). Esmalt pipeteeri kalibreerimiseks 2 μ l vett. Seejärel puhastati paberiga proovi mõõtmise koht ning uue pipetiotsikuga pipeteeri RNA kontsentratsiooni määramiseks 2 μ l proovi. Mõõtmise tulemused kirjutati tuubile ja protseduuri korrati kõigi proovidega.



Joonis 2. NanoDrop 1000 spektrofotomeeter. Foto: Thermo Fisher Scientific.

2.3.3. RNA puhastamine DNA-st (DNase töötlus)

Selleks, et eemaldada genoomne DNA RNA-st, viidi läbi DNase töötlus, kasutades RNase- vaba DNase-i (Thermo Scientific), vastavalt tootja juhendile. PCR tuubi pipeteeriti järgnevad ained: 1 μ g RNA (=1000 ng. Kogus arvutatakse vastavalt eelmises punktis tehtud RNA mõõtmisele. Kui RNA kontsentratsioon oli 1000 ng / 1 μ l, siis kasutati 1 μ l), 10 x reaktsiooni puhver $MgCl_2$ -ga 1 μ l, DNase I, RNase-vaba 1 μ l, DEPC-töödeldud vesi kuni 10 μ l.

Reaktsiooni lõplik kogus oli 10 μ l. Vee kogus sõltus sellest, kui palju RNA-t kasutati. Sellest tulenevalt oli erinevatel proovidel ka vee kogus reaktsioonis erinev. Reaktsioone inkubeeri 30 min 37°C. Seejärel lisati reaktsioonile 1 μ l 50 mM EDTA ja inkubeeri 10 min 65 °C. Tuube säilitati -20°C (kuni 2 nädalat) ja -80°C pikemaks säilitamiseks. Seda DNA-st puhastatud RNA-d kasutati järgnevas etapis pöördtranskriptsiooniks.

2.3.4. Pöördtranskriptsioon

Pöördtranskriptsioon ehk DNA süntees RNA järgi on geneetilise informatsiooni ülekanne RNA-lt DNA-le, tekib cDNA ehk komplementaarne DNA (Geneetika 2021). RNA-st cDNA sünteesimiseks kasutati SOLIScript RT cDNA sünteesi komplekti (Solis BioDyne). PCR tuubi asetati järgnevad kemikaalid: 5 µl RNA, 1 µl Oligo(dT) praimerid, 0.5 µl dNTP mix, 2 µl 10 x reaktsioonipuhver, 1 µl SOLIScript RT, 0.5 µl RiboGrip RNase inhibeerija, 10 µl H₂O, reaktsioon kokku 20 µl. cDNA sünteesiti järgneva reaktsiooniga: pöördtranskriptsioon 50 °C 60 min, ensüümi inaktiveerimine 85 °C 5 min. Sellele järgnevalt võis proove säilitada -20 °C kuni üks nädal, pikemal säilitamisel -80°C. Seda cDNA-d kasutati järgnevas sammus PCR-s, et viirust amplifitseerida.

2.3.5. PCR amplifikatsioon TMV molekulaarseks määramiseks

Kuna eelevalt viidi labi pöördtranskriptsioon (ingl. k. reverse transcription RT), siis PCR-ga kokku nimetatakse seda tehnikat RT-PCR. Reaktsiooniks kasutati 5 x HOT FIREPol Blend Master Mix-i (Solis Biosyne) vastavalt tootja juhendile. PCR tuubi pipeteeriti toatemperatuuril järgnevad kemikaalid: 5X Hot Firepol. Master Mix 4 µl, Preamer 4800f 0.6 µl, Preamer 5470r 0.6 µl, cDNA 2 µl ja H₂O 14.8 µl. Enne PCR termotsüklerisse (Eppendorf) panekut minitsentrifuugi proove.

PCR reaktsiooni tingimused olid järgnevad: esialgne denaturatsioon 95 °C 2 min; denaturatsioon 95°C 30 s; DNA kokkusulandumine (DNA kokkusulandumine, ingl. DNA *annealing*- DNA ahelate „kokkusulatamine”, üksikahelatest kaksikahelate teke (Geneetika 2021) 52 °C 30 s; elongatsioon (st. teise ja järgnevate alaüksuste (nukleotiidi või aminohappe) lülitumine makromolekuli (DNA, RNA või polüpeptiid) koosseisu (Geneetika 2021) 72 °C 45 s; denaturatsioon DNA kokkusulandumine ja elongatsioon olid 30 tsüklit. Lõplik elongatsioon 72°C 5 min, säilitamine 4 °C. Preamerid 4800f (ACACACAGTTGGACGACG) ja 5470r

(CTCATCAACGACTTCTTCTG) amplifitseerivad TMV liikumivalku ja osa polümeraasi domeeni C-otsast (Iftikhar *et al.* 2015).

2.3.6 DNA visualiseerimine geelelektroforeesiga

PCR amplifikatsiooniproduktid visualiseeriti 1% agarooši geelis. Selleks asetati 50 ml TE puhvri kohta klaaskolbi 0.5 g agasoosi pulbrit ja kuumutati seda mikrolaineahjus keemiseni, kuni agarooši lahustumiseni. Lahust jahutati voolava kraanivee all, jälgides, et vesi kolbi ei satuks. DNA visualiseerimiseks lisati 50 ml agaroošilahuse kohta 3 µl Atlas ClearSight DNA Stain-i (BioAtlas) ning saadud agaroošilahus valati kolvist geeliraami. Sinna asetati geelikamm sisse ning oodati ~20 min, kuni geel tahenes. Siis pipeteeriti 5 µl igat PCR proovi geeli ning seda jooksutati 125 V juures 30 min. Tulemus visualiseeriti UV-valguse boksis (Uvitec Cambridge).

2.3.7. PCR amplifikatsiooniproduktide puhastamine

Positiivsed PCR amplifikatsiooniproduktid puhastati enne DNA sekveneerimisele saatmist dNTP-dest, ensüümidest, praimeritest ja sooladest. Selleks kasutati GeneJET™ PCR puhastamise komplekti (Thermo Scientific). Esmalt lisati PCR produktile 1:1 ruumala Binding Bufferit ning segati proovi pipeteerides. Seejärel kanti proov pipeteerides GeneJET puhastuskolonne ning tsentrifuugiti 30 s. Kolonne põhja kogunenud lahus visati ära ja kolonnile lisati 700 µl pesupuhvrit. Proove tsentrifuugiti 30 s. ja kolonne põhja kogunenud lahus visati taas ära. Pesupuhvri täielikukus eemaldamiseks tsentrifuugiti tühja puhastuskolonne lisaks üks minut. Seejärel asetati puhastuskolonne sees olev kollektsioonkolonn uude 1,5 ml tuubi, kolonne lisati 50 µl elueerimispuhvrit ning tsentrifuugiti üks min. Puhastatud DNA-d säilitati -20 °C juures.

2.3.8 DNA järjestuse määramine ehk sekveneerimine ja fülogeneetiline analüüs

Proovide DNA järjestuste sekveneerimine viidi läbi tellimustööna Tartu Ülikooli Genoomika instituudi Eesti biokeskuse tuumiklaboris Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer'il ja kahel Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer masinal.

Sekveneeritud DNA-d visualiseeriti tarkvaraga Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA X (Kumar *et al.* 2018). Fülogeneetiliseks analüüsiks võrreldi esmalt proovi DNA-d USA Riikliku Meditsiiniraamatukogu ja Riikliku Biotehnoloogia Teabekeskuse Geenipangas olemasolevate TMV isolaatidega, kasutades BLAST programmi (BLAST). Seejärel viidi läbi fülogeneetiline analüüs, kasutades MEGA X tarkvara, kasutades maksimaalse tõenäosuse meetodit ja Tamura-Nei mudelit (Tamura, Nei 1993), rakendades paarikauguste maatriksile Neighbor-Joining ja BioNJ algoritme ning valides seejärel kõrgema logi tõenäosusega väärtusega topoloogia (Kumar *et al.* 2018).

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Sümptomite ilmnemine mehhaanilise inokulatsiooni järel

TMV-le iseloomulikud sümptomid nagu lehtede mosaiik ja kolletumine hakkasid ilmnema 7-10 päeva pärast nakatamist (Joonis 3, Lisa 1-5). Proovil nr.3 kuivasid kõik kolm tehnilist kordust ära nädal pärast nakatamist. Taimede eest hoolditseti ühtemoodi. Seega on tõenäoline, et taimede kuivamine tulenes viiruse kõrge kontsentratsioonist. Väikese võimalusena eksisteerib ka asjaolu, et taimed võisid nakatamise käigus mehaaniliselt viga saada, mille tulemusena hukkusid. Siiski on see äärmiselt vähetähtne, sest kõik töötlused tehti samamoodi. Kolm nädalat peale nakatamist olid kaks taime kolmest peaaegu täiesti ära kuivanud ka proovidel nr.4 ja nr. 6. Proovil nr. 7 oli kolm nädalat pärast nakatamist ära kuivanud üks kordus. Ülejäänud proovidel esines mosaiik (Lisa 1-5). Negatiivne proov ning proovid 1 ja 15 olid ilma sümptomiteta ning ka kiirtesti põhjal olid enagtiivne proov ja proov nr. 1 negatiivsed. Molekulaarne määramine kinnitas, et negatiivses proovis ja proovis nr.1 TMV-d ei esinenud.



Joonis 3. TMV iseloomulikud mosaiigi sümptomid proov nr. 2 lehtedel. Foto: K.Just.

Sama suitsumargiga nakatunud taimedel esinesid sarnased sümptomid. Marlboro Goldiga nakatatud taimedel on saransed süptomid, milleks on lehekuju muutus ja lehtede mosaiiksus (Joonis 4). Joonisel 5 olid taimede sümptomiteks ainult mosaiiksus lehtedel. Teisi sümptomeid LD, Green-ga nakatatud taimedel ei esinenud. Joonis 6 on näha, West, Original-ga nakatatud taimedel olid sümptomiks kasvupeetus ja taimede närbumine. Sellist sümptomit ei esinenud teistel nakatatud taimedel.



Joonis 4. Sigaretiga Marlboro Gold nakatatud taimede sümptomid. Foto: K. Palmroos.



Joonis 5. Sigaretiga LD Green nakatatud taimede sümptomid. Foto: K. Palmroos.



Joonis 6. Sigaretiga West Original nakatatud taimede sümptomid. Foto: K. Palmroos.

3.2. TMV määramine kiirtestiga

Negatiivse kontrolli kõik kolm kordust olid kiirtestiga määrares negatiivsed. Kiirtesti põhjal olid 15-st testitud proovist üks proov negatiivne ja ülejäänud 14 proovi positiivsed. Proov nr.15 määrati ainult molekulaarselt, kuna kiirtesti testiribad said otsa. Kolmandal proovil oli üks kordus negatiivne ja ülejäänud positiivsed. Proovidel nr. 2, 4 ja 5 olid kõik kordused positiivsed (Tabel 2). Proovid nr. 2, 4, 5, 10, 11, 13 ja 14 olid kiirtesti põhjal kõik kordused positiivsed. Seega 7 proovi 15-st (46,7%) olid kiirtesti põhjal positiivsed kõigi korduste lõikes. Proovidel nr. 3, 6, 7, 8, 9 ja 12 (40% valimikust) esines nii negatiivseid kui ka positiivseid kordusi. Sealjuures oli kolmel proovil (3, 9, 12) üks negatiivne ja kask positiivset kordust ning proovidel 6, 7 ja 8 esines kaks negatiivset ja üks positiivne kordus. See variatsioon võib tuleneda katse läbiviimisest kas nakatamise või testimise etapis. Positiivse aspektina viitatab kiirtesti kordustel negatiivsete proovide esinemine ristnakkuse puudumisele.

3.3. TMV nakkuse molekulaarne määramine

Kuna RNA viiruste puhul molekulaarne analüüs väga ajamahukas, kulukas ning mitmeetapiline protsess, siis ei ole seda otstarbekas rakendada kõigi proovide iga korduse analüüsimiseks. Seetõttu määrati viirus molekulaarselt juhusliku valiku alusel iga proovi ühest positiivsest kordusest, mis eelnevalt kiirtesti abil oli välja selekteeritud. Lisaks tehti molekulaarne analüüs proovil nr. 6 kahest kordusest ja proovil nr. 15 kolmest kordusest, kuna kiirtesti ribad said otsa. RNA eraldamise ja cDNA sünteesti proovide protsentarvutusel võeti arvesse siiski igast proovist üks kordus, et see oleks kooskõlas kogu molekulaarse analüüsi valimikuga- üks kordus iga proovi kohta.

Tabel 2. TMV nakkuse määramine kiirtestiga

Proovi nr.	Kordus I	Kordus II	Kordus III
Neg.*	-	-	-
1	-	-	-
2	+	+	+
3	-	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	+	-
9	-	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	-	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	-	-	-

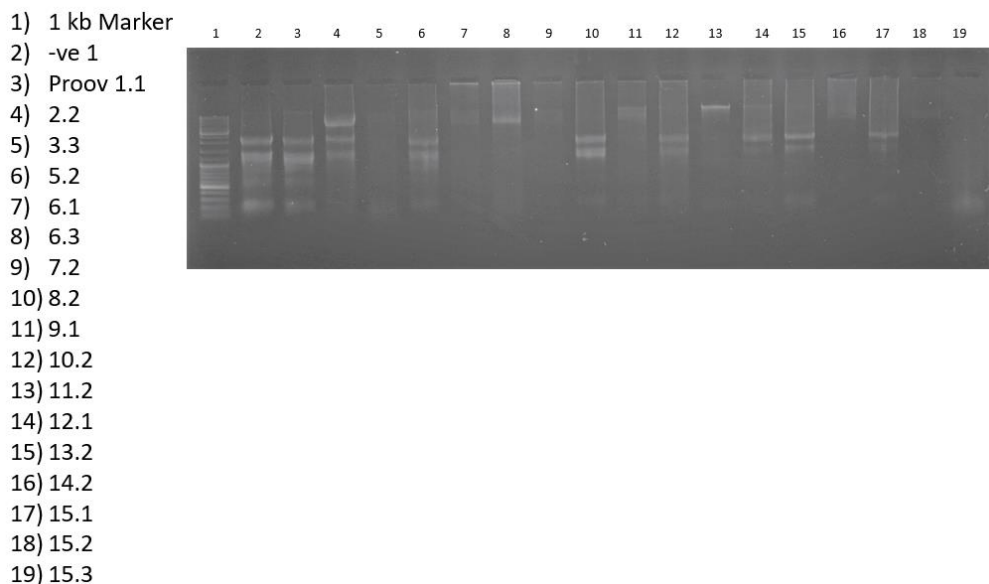
*Negatiivne kontroll

3.3.1. RNA eraldamine ja kontsentratsioon

Proovide RNA kontsentratsioon oli vahemikus 17.6 - 1506.9 ng/ µl (Tabel 3). Kontsentratsioonide suur varieeruvus võis tuleneda nii taime seisukorrast proovi kogumise hetkel kui ka proovide käsitlemisest RNA eraldamise käigus. Negatiivsel kontrollil sümptome ei esinenud, tema kehed olid rohelised ja elujõulised ning seetõttu oli neist võimalik ka väga kõrge kontsentratsiooniga RNA-d eraldada.

RNA geelilt (Joonis 7) selgub, et proovide nr- 3, 6, 7, 9, 11 ja 14 RNA eraldamine ei õnnestunud. Sellele viitab ka nende proovide väga madal RNA kontsentratsioon (28.6- 76 ng/

µl). RNA geelil peaks olema näha kaks fragmenti, kuid antud proovidel on visualiseerunud kas ainult üks kõrgem fragment või ei ole seal midagi näha. Kuna nimetatud proovide RNA eraldamine ei õnnestunud, siis ei olnud nendest võimalik ka viirust molekulaarselt määrata, sest eraldatud RNA kvaliteet on aluseks järgnevatele sammudele viiruse molekulaarsel määramisel. RNA eraldamine õnnestus proovidel nr. 2, 4, 5, 8, 10,12 ja 13.



Joonis 7. TMV proovide RNA. Geeli tingimused: 1% agaros, 125 V, 30 min.

3.3.2. Pöördtranskriptsioon ehk cDNA süntees

cDNA geelil peaks olema näha ühtlane hajus pikk fragment nagu negatiivsel proovil ja proovidel nr. 1 ja 2 (Joonis 8). Kõigil ülejäänud proovidel cDNA geelil fragment kas puudub või on see madalal. Põhjus võis olla proovide käsitlemises cDNA töötamise käigus.

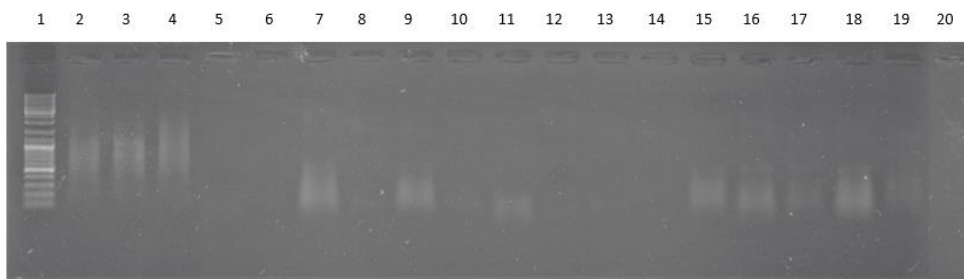
Kui arevstada iga proovi kohta üks kordus, siis nii RNA eraldamine kui ka cDNA süntees õnnestusid 20% proovidel: negatiivsel kontrollil ning proovidel nr. 1 ja 2 (Tabel 4). Nii RNA eraldamine kui ka cDNA süntees olid mõlemad tulemusteta 33% proovidest- nr. 3.3, 4.2, 6.3, 11.2 ja 15.3.

Tabel 3. TMV proovide RNA kontsentratsioonid

Proovi nr.	Konts. ng/ µl
Neg. 1	1506.9
1.1	662.9
2.2	867.1
3.3	32
4.2	17.6
5.2	403
6.1	28.6
6.3	183.9
7.2	23.6
8.2	879.4
9.1	76
10.2	433.3
11.2	42.2
12.1	202.3
13.2	880.7
14.2	40.8
15.1	882.8
15.2	71.3
15.3	32.5

Proove, mille RNA eraldamine töötas, kuid cDNA süntees ei õnnestunud, oli 26,6%- proovid nr. 5.2, 8.2, 10.2, 12.1. Kahel proovil (13.2 ja 15.1) RNA eraldamine toimis, kuid cDNA sünteesi geelil visualiseerus 100 bp fragment. Esines ka selliseid proove (7.2, 9.1, 14.2), mille RNA eraldamine ei õnnestunud, kuid cDNA sünteesi geelil esines 100 bp suurune hajus fragment. Selline 100 bp fragment cDNA sünteesil viitab paraku siiski ebaõnnestunud cDNA sünteesile ning sellest cDNA-st ei õnnestu viirust amplifitseerida PCR-ga.

- 1) 1 kb Marker
- 2) -ve 1
- 3) Proov 1.1
- 4) 2.2
- 5) 3.3
- 6) 4.2
- 7) 5.2
- 8) 6.1
- 9) 6.3
- 10) 7.2
- 11) 8.2
- 12) 9.1
- 13) 10.2
- 14) 11.2
- 15) 12.1
- 16) 13.2
- 17) 14.2
- 18) 15.1
- 19) 15.2
- 20) 15.3



Joonis 8. TMV proovide cDNA. Geeli tingimused: 1% agaros, 125 V, 30 min.

3.3.3. TMV amplifikatsioon RT-PCR-ga

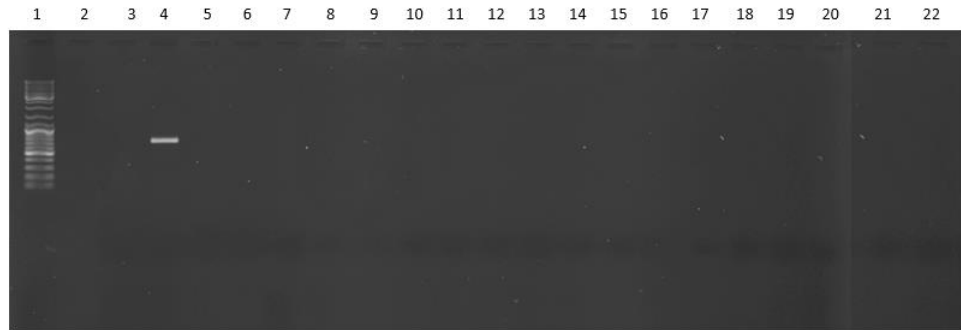
Kuna nii RNA eraldamine kui ka cDNA süntees õnnestusid edukalt negatiivsel proovil ning proovidel nr 1 ja 2, siis nendest proovidest oli eelduste kohaselt võimalik viirust määrata. Ka kõigist neist proovidest, millel esinesid sümptomid ja ka kiirtest oli positiivne, oleks eeldatavalt pidanud saama TMV-d molekulaarselt määrata. Tõenäoliselt on need proovid siiski positiivsed ja RNA eralamisel ja/või cDNA sünteesil oli probleem proovide töötlemisega. Molekulaarselt õnnestus TMV määrata proovist nr. 2.2 (proov number kaks, teine tehniline kordus) (Joonis 9). Kõigi teiste proovide PCR oli negatiivne. Proovi nr. 2.2 puhastatud PCR produkti kontsentratsioon oli 6 ng/ μ l ning seda saadeti sekveneerimisele 8 μ l. Sekveneerimisele saadeti koos prooviga ka 6 μ l TMV PCR praimerit 4800f.

Tabel 4. RNA eraldamise ja cDNA sünteei võrdlus

Proovi nr.	RNA eraldamine	cDNA süntees
Neg.1	+	+
1.1	+	+
2.2	+	+
3.3	-	-
4.2	-	-
5.2	+	-
6.1	-	MK*
6.3	-	-
7.2	-	MK*
8.2	+	-
9.1	-	MK*
10.2	+	-
11.2	-	-
12.1	+	-
13.2	+	MK*
14.2	-	MK*
15.1	+	MK*
15.2	-	MK*
15.3	-	-

MK* - madal kvaliteet, reagentide jäägid

- 1) 1 kb Marker
- 2) -
- 3) Proov 1.1
- 4) 2.2
- 5) 3.3
- 6) 4.2
- 7) 5.2
- 8) 6.1
- 9) 6.3
- 10) 7.2
- 11) 8.2
- 12) 9.1
- 13) 10.2
- 14) 11.2
- 15) 12.1
- 16) 13.2
- 17) 14.2
- 18) 15.1
- 19) 15.2
- 20) 15.3
- 21) Neg.1
- 22) H2O



Joonis 9. TMV amplifitseerimine RT-PCR-ga. Geeli tingimused: 1% agaros, 125 V, 30 min.

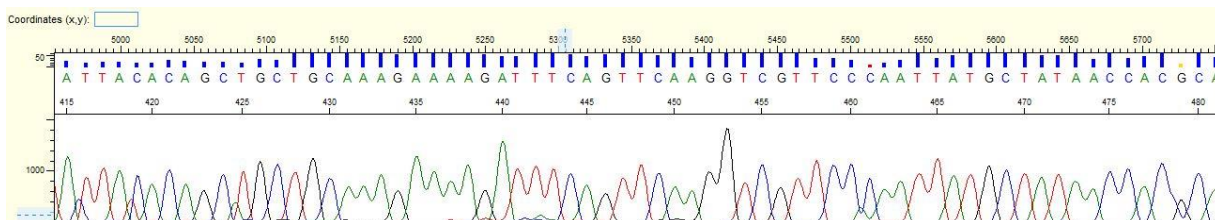
3.3.4. TMV sekveneerimine ja fülogeneetiline analüüs

Proovi nr. 2 (sigaret Camel Blue) PCR-ga amplifitseeritud DNA järjestus (Joonis 10-11) oli kõige identsem- 95.68% TMV isolaadile Hiinast (DNA proovi ID MH595920) (Joonis 12). Lisaks näitas proov kõrget sarnasust- 95.09- 95.54% teistele TMV Hiina isolaatidele, 95.10 % isolaadile Sloveeniaast ning 94,95% TMV isolaadile Hispaaniast.

```
GGGGGTTTCAGGACCGCCCCCTCCGGTTCGTTTGTATTATAAAAGTCTGGTAAAGTATT
TGTCTGATAAAGTTCTTTTTAGAAAGTTTGTATTATAGATGGCTCTAGTTGTAAAGG
GAAAGTGAACATCAATGAGTTTATTGACCTGACAAAAATGGAGAAGATCTTACCG
TCGATGTTTACTCCTGTAAAGAGTGTCATGTGTTCCAAAGTTGATAAAATAATGGT
TCATGAGAATGAGTCATTGTCAGAGGTGAATCTTCTTAAAGGTGTTAAGCTTATTG
```

ATAGTGGGTATGTTTGTGTTAGCCGGTCTGGTCGTTACGGGCGAGTGGAATTTGCCT
GACAATTGCAGAGGAGGTGTGAGCGTGTGTTTGGTGGACAAAAGGATGGAAAGA
GCAGACGAAGCCACGCTTGGATCCTATTACACAGCTGCTGCAAAGAAAAGATTTC
AGTTCAAGGTCGTTCCCAATTATGCTATAACCACGCAGGACGCGATGAAAAATGT
CTGGCAAGTGTTAGTCAATATTAGAAATGTGAAGATGTCAGCGGGTTTCTGTCCG
CTTTCTCTGGAGTTTGTGTCTGGTATGTATTGTTTATAGAAATAATATAAAATTAGG
TTTGAGAGAGAAAATTACAAACGTGAGAGACGGAGGGCCCATGGAATTACAGA
AGAAGCGTTTTTGATGAGA

Joonis 10. TMV proov nr. 2 sekveeritud DNA proovi nukleotiidide järjestus.

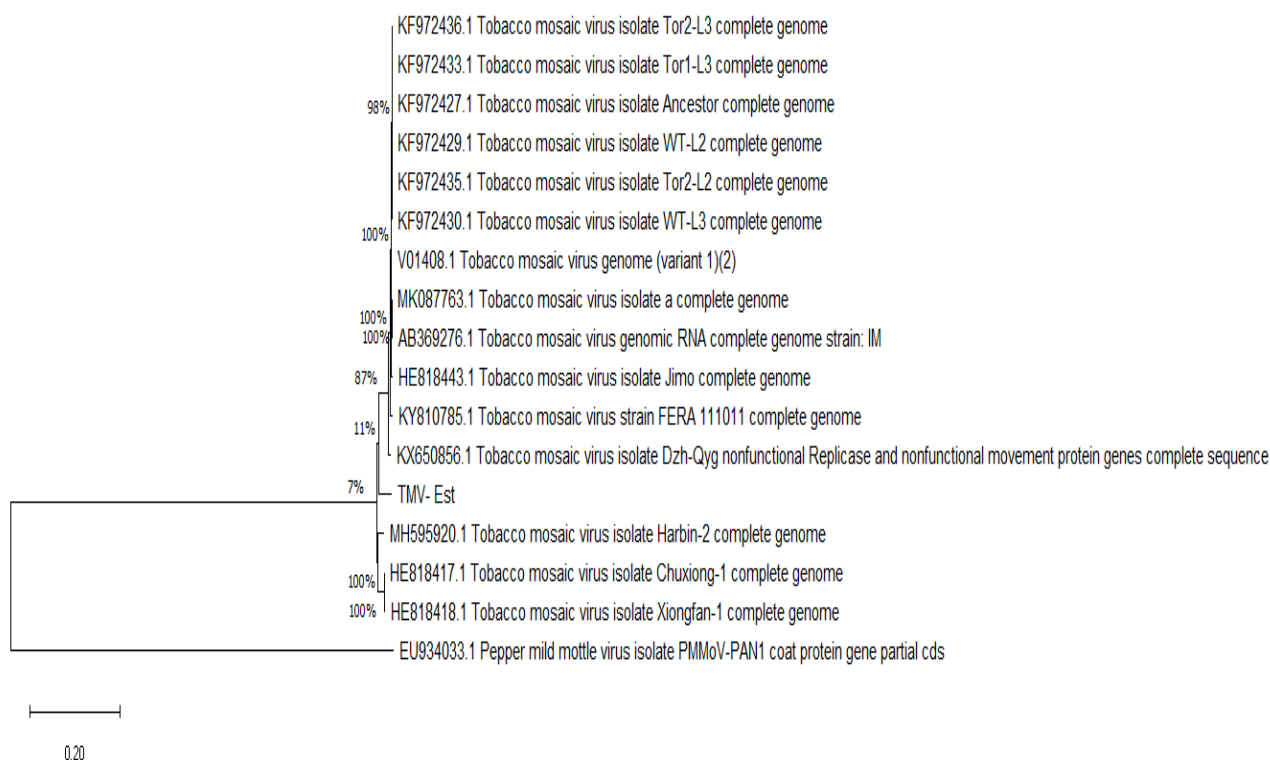


Joonis 11. TMV proov nr. 2 sekveeritud DNA proovi nukleotiidide järjestuse osaline kromatogramm (MEGA X).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Tobacco mosaic virus isolate Harbin-2 .complete genome	Tobacco mosaic...	1079	1079	98%	0.0	95.68%	6395	MH595920.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Harbin-1 .complete genome	Tobacco mosaic...	1074	1074	98%	0.0	95.54%	6395	MH595919.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Chuxiong-1 .complete genome	Tobacco mosaic...	1068	1068	98%	0.0	95.39%	6395	HE818417.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Xiongfai-1 .complete genome	Tobacco mosaic...	1066	1066	98%	0.0	95.38%	6394	HE818418.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Shenyang .complete genome	Tobacco mosaic...	1057	1057	98%	0.0	95.09%	6395	MG516107.1
✓	Tobacco mosaic virus strain FERA_111011 .complete genome	Tobacco mosaic...	1057	1057	98%	0.0	95.10%	6396	KY810785.1
✓	Plant transient expression vector pGR2i-dCP:GFP .complete sequence	Plant transient e...	1057	1057	98%	0.0	95.10%	11229	KF981446.1
✓	Tobacco mosaic virus genome (variant 1)	Tobacco mosaic...	1057	1057	98%	0.0	95.10%	6395	V01408.1
✓	Tobacco mosaic virus genome (variant 2)	Tobacco mosaic...	1057	1057	98%	0.0	95.10%	6398	V01409.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate a .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6395	MK087763.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Tor2-L3 .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6276	KF972436.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Tor2-L2 .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6276	KF972435.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Tor2-L1 .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6276	KF972434.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Tor1-L3 .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6276	KF972433.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Tor1-L1 .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6276	KF972431.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate WT-L3 .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6276	KF972430.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate WT-L2 .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6276	KF972429.1
✓	Tobacco mosaic virus isolate Ancestor .complete genome	Tobacco mosaic...	1051	1051	98%	0.0	94.95%	6276	KF972427.1

Joonis 12. TMV proov nr.2 võrdlus teiste TMV isolaatidega, kasutades BLAST programmi.

Fülogeneetiline analüüs valiku teiste TMV isolaatidega kinnitas, et Eestis müüdavast sigaretist isoleeritud TMV proov nr.2 grupeerus Hiina, Hispaania ja Sloveenia isolaatidega (Joonis 13).



Joonis 13. Eestis müüdavast sigaretist Camel Blue amplifitseeritud TMV isolaadi (TMV-Est) fülogeneetiline analüüs.

KOKKUVÕTE

Eestis ei ole antud tööga sarnaseid katseid varem läbi viidud, kuid välismaal tehtud uuringute põhjal on TMV turustatavates sigarettides sageli esinev ja tänu viiruse mehhaanilisele ülekandele ka sigarettide kaudu edasikantav. Kuna kogu maailmas suitsetatakse iga päev üle 15 miljardi sigareti (WHO 2021), tähendab see, et inimesed puutuvad massiliselt kokku TMV RNA-ga. Kuigi praeguse dogma põhjal ei ole taimeviirused loomadele ega inimesele patogeensed (Balique *et al.* 2012), siis eksisteerib oht levitada viirust taimekasvatustes, eriti maavitsaliste sugukonda kuuluvatel peremeestaiedel.

Käesolev katse näitas, et Eestis müüdavates sigarettides esineb tubaka mosaiigiviirust. Kiirtesti põhjal esines 15-st juhuslikult valitud suitsumargist TMV nakkus 14-l. Süntomite põhjal esineb nakkus 10 proovil, kuid molekulaarselt õnnestus viirus määrata ühest proovist Camel Blue. Sekveneeritud DNA oli 95.68% identne TMV isloaadile Hiinast (DNA proovi ID MH595920). Kuigi 12 proovi RNA eraldamine ei õnnestunud, siis nakatatud taimedel arenenud sümptomite põhjal saab oletada, et lisaks proovile nr. kaks olid positiivsed veel 9 proovi. Kiirtesti põhjal saab aga oletada, et 14 proovi olid positiivsed.

Magistritöös saaks proovide RNA eraldamist ja cDNA sünteesi korrata ning suurendada proovide arvu, et saada parem ülevaade TMV levikust ja geneetilisest kuuluvusest Eestis müüdavates sigaretitoodetes. Põllumajandusettevõtetes tuleb suitsetaval personalil olla ettevaatlik ning rakendada TMV leviku tõkestamiseks fütosanitaarseid ettevaatusabinõusid. Väga oluline on kätehügieen pärast suitsetamist, sooviatav oleks taimedega töötades võimaliku TMV leviku takistamiseks kaustada taimede käsitlemisel kummikindaid ning disinfitseerida töövahendeid.

SUMMARY

No experiments similar to this work have been performed in Estonia before. On the basis of research conducted abroad, TMV is common in marketed cigarettes. With more than 15 billion cigarettes (WHO 2021) smoked worldwide every day, people are commonly exposed to TMV RNA. Although, based on the current dogma, plant viruses are not pathogenic to animals or humans (Balique *et al.* 2012), there is risk of transmission of plant viruses due to human activity.

This experiment showed that cigarettes sold in Estonia contain tobacco mosaic virus. Based on a rapid test, 14 of the 15 randomly selected ssigarette brands had TMV infection. Based on the symptoms, infection is present in 10 samples, but the virus was molecularly detected in one sample, Camel Blue. The sequenced DNA was 95.68% identical to TMV isolate from China (DNA sample ID MH595920). Although RNA isolation was not successful in 12 samples, the symptoms developed on the infected plants suggest that in addition to sample number 2, there were another 14 positive samples.

The master's thesis could repeat the RNA isolation and cDNA synthesis of samples and increase the number of samples to obtain the spread and genetic affiliation of TMV in cigarette products sold in Estonia. The hand hygiene of smoking personnel after smoking is very important. It would be advisable to wear rubber gloves and disinfect tools when handling plants to prevent the possible spread of TMV.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Advances In Seed Biology. (2017). Jimenez-Lopez, J. C. [on-line]. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68178> . (10.04.2021).
- Alishiri, A., Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, R-H., Palukaitis, P.** (2013). Prevalence of Tobacco mosaic virus in Iran and Evolutionary Analyses of the Coat Protein Gene. *The Plant Pathology Journal* 29(3):260–73. [e-ajakiri] doi: [10.5423/PPJ.OA.09.2012.0145](https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2012.0145). (20.04.2021).
- Ambrós, S., F. Martínez, P. Ivars, C. Hernández, F. de la Iglesia, ja S. F. Elena.** (2016). Molecular and Biological Characterization of an Isolate of Tomato Mottle Mosaic Virus (ToMMV) Infecting Tomato and Other Experimental Hosts in a Greenhouse in Valencia, Spain. *BioRxiv*. [e-ajakiri] 063255. doi: 10.1101/063255. (10.04.2021).
- Balique F., Colson P., Raoult D.** (2012). Tobacco mosaic virus in cigarettes and saliva of smokers.- *Journal of Clinical Virology* 55, 374-376. [e-ajakiri] <https://digital.csic.es/bitstream/10261/220653/1/beyondholo.pdf>. (11.05.2021).
- Bennett M.D., Ilia J. Leitch J.I.** (1995). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms.- *Annals of Botany* 76(2):113–76. [e-ajakiri] doi: 10.1006/anbo.1995.1085. (30.03.2021).
- Bioreba. (202). <https://www.bioreba.ch/saas/web/bioreba/>. [Veebileht]. (23.03.2021)
- BLAST. (2021). Basic Local Alignment Search Tool. [Veebileht] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (12.05.2021)
- Caciagli, P.** (2008). Vegetable Viruses. Lk 282–90 *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*, toimetanud B. W. J. Mahy ja M. H. V. Van Regenmortel. Oxford: Academic Press. [on-line] <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00650-6> (28.04.2021).
- Chase W.M., Knapp S., Cox V.A., Clarkson J.J., Butsko Y., Joseph J., Savolainen V., Parokonny.** (2003). Molecular Systematics, GISH and the Origin of Hybrid Taxa in Nicotiana (*Solanaceae*)- *Annals of Botany* 92(1):107–27 [e-ajakiri]. doi: 10.1093/aob/mcg087. (30.03.2021).
- Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V., Grob, J-J., Berbis, P., Lecoq, H., Harlé, J-R., Berland, Y., Raoult, D.** (2010). .Pepper Mild Mottle Virus, a Plant Virus Associated with Specific Immune Responses, Fever, Abdominal Pains, and Pruritus in Humans. [e-ajakiri]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010041>. (11.04.2021).

- Darzi, E., Smith, E., Shargil, D., Lachman, O., Ganot, L., Dombrovsky, A.** (2018). The Honeybee *Apis Mellifera* Contributes to Cucumber Green Mottle Mosaic Virus Spread via Pollination- *Plant Pathology* 67(1):244–51.[e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12702>. (10.04.2021).
- Ding, B., Kwon O-M., Warnberg, L.** (1996). Evidence That Actin Filaments Are Involved in Controlling the Permeability of Plasmodesmata in Tobacco Mesophyll- *The Plant Journal* 10(1):157–64. [e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010157.x>.
- Dong, Y., Burch-Smith, M. T., Liu, Y., Mamillapalli, P., Dinesh-Kumar, P.S.** (2007). A Ligation-Independent Cloning Tobacco Rattle Virus Vector for High-Throughput Virus-Induced Gene Silencing Identifies Roles for *NbMADS4 - 1* and *- 2* in Floral Development- *Plant Physiology* 145(4):1161–70. doi:[e-ajakiri] 10.1104/pp.107.107391. (05.04.2021).
- FAO. (2021). FAOSTAT. [veebileht] (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>). (10.04.2021)
- Fu, D-Q., Zhu, Z-B., Zhu, L-H., Jiang, B-W., Luo, B-Y.** (2005). Virus-Induced Gene Silencing in Tomato Fruit- *The Plant Journal* 43(2):299–308. [e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02441.x>. (05.04.2021).
- Garg, M.** (2021). Tobacco Mosaic Virus (TMV): Structure and Replication. [Veebileht] <https://www.biologydiscussion.com/viruses/tobacco-mosaic-virus-tmv-structure-and-replication/54903> (12.04.2021)
- Geneetika, (2021). Sõnastik geneetikahuvilistele. [Veebileht] <http://geneetika.ee/lexicon/poordtranskriptsioon/> (03.05.2021)
- Geneious Prime (2021). <https://www.geneious.com> [Veebileht] (17.05.2021)
- Gergerich, C.R., Dolja, V.V.** (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. [Veebileht]. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01 (20.04.2021)
- Goodin, M. M., Dietzgen, G.R., Schichnes, D., Ruzin, S., Jackson, O.A.** (2002). PGD Vectors: Versatile Tools for the Expression of Green and Red Fluorescent Protein Fusions in Agroinfiltrated Plant Leaves- *The Plant Journal* 31(3):375–83. [e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01360.x>. (05.04.2021).
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Rayapati, D., Naidu, A., Lommel, A. S.** (2007) *Nicotiana Benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions- *Journal Of General Virology* Volume 88, Issue 6 [e-ajakiri] <https://doi.org/10.1099/vir.0.82698-0> (05.04.2021).
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Rayapati, N., Lommel, S.** (2008). *Nicotiana benthamiana* : Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions- *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 21:1015–26. [e-ajakiri] doi: 10.1094/MPMI-21-8-1015. (30.03.2021).
- Hema, M., Vardhan, V. P.G., Savithri, S. H., Murthy, N. R.M.** (2019). Emerging Trends in the Development of Plant Virus-Based Nanoparticles and Their Biomedical Applications“. Lk 61–

- 82 *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, toimetanud V. Buddolla. Academic Press. [on-line] <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00006-4> (30.04.2021).
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Revers, F.** (2013). Viral and Cellular Factors Involved in Phloem Transport of Plant Viruses- *Frontiers in Plant Science* 4. [e-ajakiri] doi: 10.3389/fpls.2013.00154. (10.04.2021).
- Holzem, A., Nähring, M.J., Fischer, R.** (2001). Rapid identification of a tobacco mosaic virus epitope by using a coat protein gene-fragment-pVIII fusion library. *Journal of General Virology*. [e-ajakiri] 82(1):9–15. doi: [10.1099/0022-1317-82-1-9](https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-1-9). (11.04.2021).
- Hu, Q., Niu, Y Zhang, K., Liu, Y., Xueping Zhou, Y.** (2011). Virus-Derived Transgenes Expressing Hairpin RNA Give Immunity to Tobacco Mosaic Virus and Cucumber Mosaic Virus- *Virology Journal* 8(1):41. [e-ajakiri] doi: 10.1186/1743-422X-8-41. (11.04.2021).
- Iftikhar, Y., Jackson, R., Neuman, B.W.** (2015) Detection of Tobacco mosaic tobamovirus in cigarettes through RT-PCR. – *Pakistani Journal of Agricultural Sciences*, Nr 52(3), lk 667-670.
- Itaya, A., Woo, M-Y., Masuta, C., Bao, Y., Nelson, S. R., Ding, B.** (1998). Developmental Regulation of Intercellular Protein Trafficking through Plasmodesmata in Tobacco Leaf Epidermis. *Plant Physiology* 118(2):373–85. [e-ajakiri] doi: 10.1104/pp.118.2.373.
- Kelman, A., Peterson, D. P.** (2002). Contributions of Plant Scientists to the Development of the Germ Theory of Disease- *Microbes and Infection* 4(2):257–60. [e-ajakiri] doi: 10.1016/S1286-4579(01)01532-5. (11.04.2021).
- Knapp, S., Chase, W.M., Clarkson. J.J.** (2004). Nomenclatural Changes and a New Sectional Classification in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *TAXON* 53(1):73–82. [e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.2307/4135490>. (30.03.2021).
- Kumagai, M. H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., L. K. Grill, K. L.** (1995). Cytoplasmic Inhibition of Carotenoid Biosynthesis with Virus-Derived RNA- *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(5):1679–83. [e-ajakiri] doi: 10.1073/pnas.92.5.1679. (30.03.2021).
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K.** (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Kurd, H.** (2019). Tobacco Mosaic Virus TMV (History + Symptoms + Structure + Life Cycle). Botnam, Knoweldege seeker's cave. [Veebileht] <https://botnam.com/tobacco-mosaic-virus-tmv/>. (25.04.2021)

- Lanter, J. M., McGuire, J., Goode, J.M.** (1982). Persistence of Tomato Mosaic Virus in Tomato Debris and Soil under Field Conditions- *Plant Disease* 66(7):552–55. [e-ajakiri] DOI : 10.1094/PD-66-552. (10.04.2021).
- Levitzky, N., Smith, E., Lachman, O., Luria, N., Mizrahi, Y., Bakelman, H., Sela, N., Laskar, O., Liu, R., Vaishnav, A. R., Roberts, M, A., Friedland P. R.** (2013). Humans Have Antibodies against a Plant Virus: Evidence from Tobacco Mosaic Virus. [e-ajakiri] <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060621>. (10.04.2021).
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, P. S.** (2002). Virus-Induced Gene Silencing in Tomato- *The Plant Journal* 31(6):777–86.[e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x>. (05.04.2021).
- Olszewska, W., Steward, W. M.** (2003). The Molecular Basis of the Antigenic Cross-Reactivity between Measles and Cowpea Mosaic Viruses- *Virology* 310(1):183–89. [e-ajakiri] doi: 10.1016/S0042-6822(03)00118-1. (11.04.2021).
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, M.A., Baulcombe, C. D.** (2001). Technical Advance: Tobacco Rattle Virus as a Vector for Analysis of Gene Function by Silencing- *The Plant Journal* 25(2):237–45. [e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x>. (05.04.2021).
- Rifkind, D., Freeman, L.G.** (2005). 11 -TOBACCO MOSAIC VIRUS. Lk 81–84 *The Nobel Prize Winning Discoveries in Infectious Diseases*, toimetanud D. Rifkind ja G. L. Freeman. London: Academic Press. [on-line] <https://doi.org/10.1016/B978-012369353-2/50018-7> (24.04.2021).
- Scholthof, K-B. G.** (2000). Tobacco Mosaic Virus. [veebileht] <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/TobaccoMosaic.aspx> (12.04.2021).
- Scholthof, K-B.G.** (2008). Tobacco Mosaic Virus: The Beginning of Plant Pathology. [Veebileht] APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeatures-2008-0408. (12.04.2021)
- Schöb, H., Kunz, C., Meins Jr, F.** (1997). Silencing of Transgenes Introduced into Leaves by Agroinfiltration: A Simple, Rapid Method for Investigating Sequence Requirements for Gene Silencing- *Molecular and General Genetics MGG* 256(5):581–85.[e-ajakiri] doi: 10.1007/s004380050604. (05.04.2021).
- Shriver, P.L., Koudelka, J.K., Manchester, M.** (2009). Viral Nanoparticles Associate with Regions of Inflammation and Blood Brain Barrier Disruption during CNS Infection- *Journal of Neuroimmunology* 211(1):66–72. [e-ajakiri] doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.03.015. (11.04.2021).
- Smith, E., Dombrovsky, A.** (2019). Plant Pathology and Management of Plant Diseases: Aspects in Tobamovirus Management in Intensive Agriculture. [on-line]. DOI:10.5772/intechopen.87101. (12.04.2021).

- Solovyev, A. G., Makarov, V.V.** (2016). Helical capsids of plant viruses: architecture with structural lability- *Journal of General Virology* 97(8):1739–54[e-ajakiri] doi: 10.1099/jgv.10.000524. (10.04.2021).
- Tamura, K., Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Thermo Fisher Scientific. (2021). <https://www.thermofisher.com/ee/en/home.html> . [Veebileht] (23.03.2021)
- Thomas, L. C., Jones, L., Baulcombe, C. D., Maule, J. A.** (2001). Size Constraints for Targeting Post-Transcriptional Gene Silencing and for RNA-Directed Methylation in *Nicotiana Benthamiana* Using a Potato Virus X Vector- *The Plant Journal* 25(4):417–25. [e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00976.x>. (30.03.2021).
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D.** (2003). Retracted: An Enhanced Transient Expression System in Plants Based on Suppression of Gene Silencing by the P19 Protein of Tomato Bushy Stunt Virus- *The Plant Journal* 33(5):949–56. [e-ajakiri] doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x>. (05.04.2021).
- Webster, G. C., Rosskopf, N.E., Pierce, F., Lucas, L., Mellinger, C. H.** (2014). First Report of Tomato Mottle Mosaic Virus Infecting Tomato in the United States- *Plant Health progress Vol.15, No. 4. 151-152.*[e-ajakiri] Microsoft Word - BR-14-0023.docx (apsnet.org) . (10.04.2021).
- WHO. <https://www.who.int/tobacco/en/atlas8.pdf> [Veebileht] (16.05.2021)

LISAD

Lisa 1. TMV sümptomid proovil nr. 4.3 (Neljanda proovi 3. tehniline kordus) (A) ja 5.2 (B). Foto: K.Just



Lisa 2. TMV sümptomid proovil nr. 5.3. Foto: K.Just



Lisa 3. TMV sümptomid proovil 6.2 (A) ja 7.3 (B). Foto: K.Just



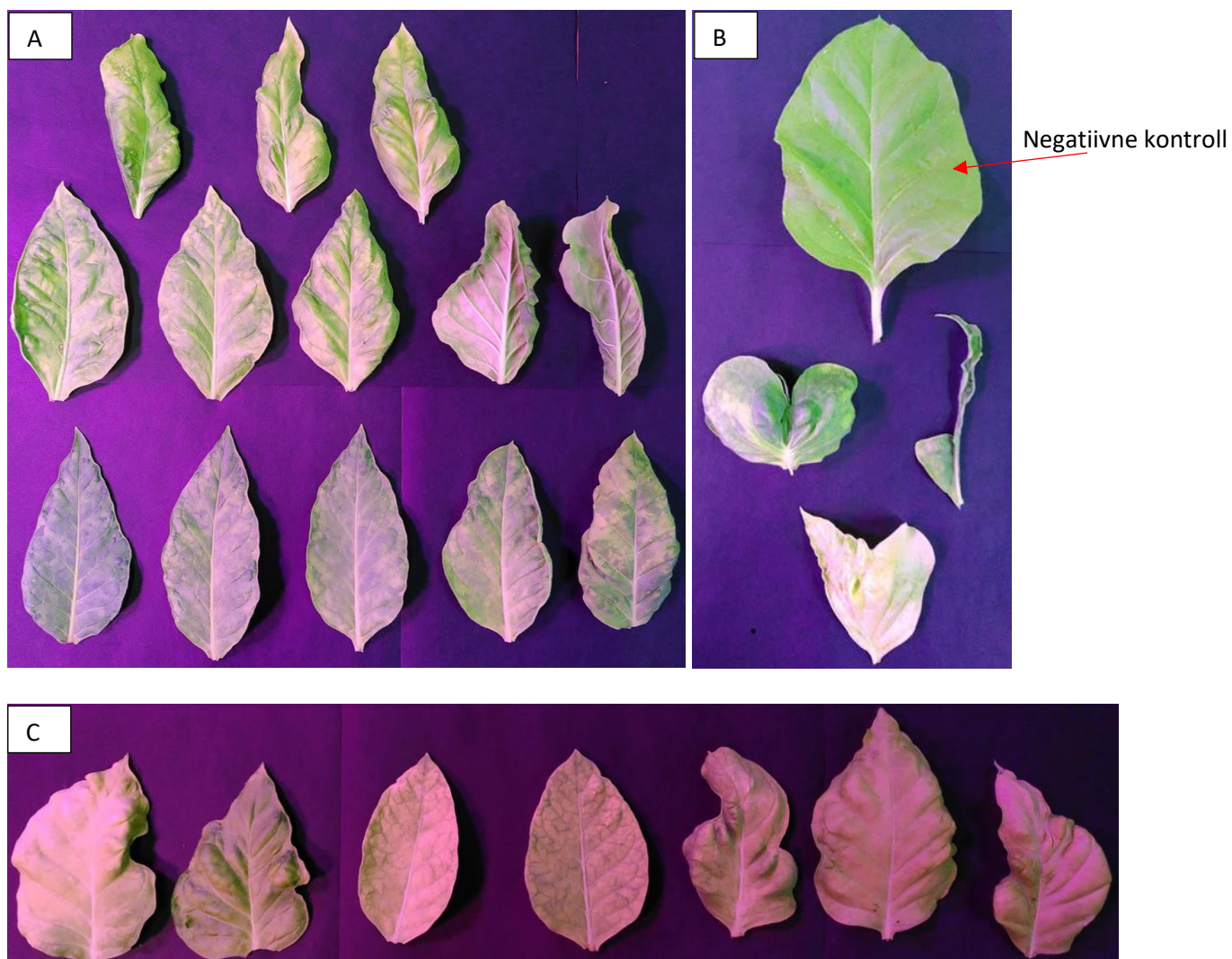
Lisa 4. TMV sümptomid proovil nr. 10.2. Foto: K.Just



Negatiivne kontroll



Lisa 5. TMV sümptomid proovil nr. 10.3 (A-B) ja 11.3 (C). Foto: K.Just



Lisa 5. TMV sümptomid proovil nr. 15.1. Foto: K.Just



Lihthitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Karina Palmroos,
(sünniaeg 11.06.1998)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihthitsentsi) enda loodud lõputöö Tubaka mosaiikviiruse esinemine Eestis müügilolevates sigarettides , mille juhendaja on Kadri Just, Andres Kvarnheden,

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihthitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor

allkiri

Karina Palmroos

Tartu, 25.05.2021

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)